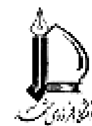


Iranian Food Science and Technology Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir



Research Article
Vol. 19, No. 5, Dec.-Jan. 2023, p. 649-661

Cell Culture of Spirulina Microalgae (*Spirulina platensis*) and Comparison the Efficiency of Enzymatic, Ultrasound, Freeze-defrosting and Mineral Solvent Methods in Extraction of Phycocyanin Pigment

R. Safari[1*], S. Reyhani Poul[2]

1- Assistant Professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education And Extention Organization, Sari, Iran
2- Ph.D. Graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
(*- Corresponding Author Email: Safari1351@gmail.com)

Received: 2022.09.17 Revised: 2022.12.09 Accepted: 2022.12.24 Available Online: 2023.01.02	**How to cite this article:** Safari, R., & Reyhani Poul, S. (2023). Cell culture of spirulina microalgae (*Spirulina platensis*) and comparison the efficiency of enzymatic, ultrasound, freeze-defrosting and mineral solvent methods in extraction of phycocyanin pigment. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(5), 649-661. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78800.1204

Introduction

Phycocyanin is one of the pigments used in the food industry due to its antioxidant and antibacterial as well as coloring properties. This pigment is commercially produced from *Spirulina platensis* microalgae, in the form of photoautotrophic cultures and in open environments in large ponds or pools in tropical or subtropical areas at the edges of oceans. Different techniques are used in order to extract phycocyanin from spirulina microalgae.. Each technique has its own advantages and disadvantages besides different efficiency. These methods include freezing-defrosting, enzymatic, ultrasound, high hydrostatic pressure, ultracentrifuge, ultra homogenization, extraction using water and various solvents. Of course recently, the production of recombinant phycocyanin has been considered as a suitable option for the production of heterotrophic phycocyanin. The purpose of the current research was to cultivate *Spirulina platensis*, evaluation of the microalgae growth process, and comparison of the efficiency of different methods in the extraction of phycocyanin pigment.

Materials and Methods

The pure sample of *Spirulina platensis* microalgae was prepared from Algaeology Laboratory, Biology Department of Tarbiat Modares University. For the cultivation of spirulina, Zarrouk culture medium with different compositions was used, and after cultivation in smaller scales (100 and 500 ml), the final cultivation was carried out in volumes of 5 and 50 liters. After cultivating the microalgae and exposing them to fluorescent light with appropriate light lux intensity (3500 to 8000) and a period of 12 hours of darkness and 12 hours of light, the samples were placed at 29 °C for 16 days. In order to evaluate the growth process of the algal mass, the absorbance of the solution containing the algal cells was read at a wavelength of 540 nm. After preparing the dry mass of spirulina microalgae, four methods of ultrasound, freezing-defrosting, enzymatic and mineral solvent technique were used to extract phycocyanin. In the next steps, the efficiency of each method was evaluated by measuring the concentration and purity of phycocyanin. In addition, the effect of applying the purification process by ammonium sulfate on the concentration and purity of the extracted pigment was also evaluated. This research was conducted in a completely randomized design and SPSS and EXCEL softwares were used

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78800.1204

for statistical analysis and drawing of diagram, respectively. Data were analyzed using one-way analysis of variance and the difference between the means was evaluated by Duncan's test at 95% confidence level.

Results and Discussion

The results showed that microalgae growth from day 0 to 14 had an upward trend and the resulting changes were significant at all times, except days 14 and 16 ($p<0.05$). Also, after passing the short resting phase (2 days), the microalgae entered the logarithmic growth phase and continued to grow until the 14th day, but between the 14th and 16th days, the growth was almost constant. In the following, it was found that the mass produced after 16 days is 1120 mg/l. The concentration of phycocyanin extracted in enzymatic and ultrasound methods (1.815 and 1.786 mg/ml, respectively) had no significant difference ($p>0.05$) and was at a higher level than the other two methods ($p<0.05$); In addition, the pigment concentration was higher in the freezing-defrosting technique (1.535 mg/ml) than in the mineral solvent method (1.121 mg/ml). After purification of the pigment using ammonium sulfate, the pigment concentration and purity increased significantly in each method ($p<0.05$). The results of this research showed that by choosing the optimal method and applying the purification process using ammonium sulfate, the extraction efficiency of phycocyanin from Spirulina microalgae (*Spirulina platensis*) could be increased.

Conclusion

Based on the results of this research, the growth trend of *Spirulina platensis* in Zarrouk culture medium was ascending first and then constant (during 16 days). Ultrasound technique and enzymatic method (lysozyme enzyme) to extract phycocyanin pigment from *Spirulina platensis* microalgae have more efficiency than freezing-defrosting and inorganic solvent (hydrochloric acid) methods. Also, purification of the extracted pigment using 40% ammonium sulfate increases the concentration and purity of phycocyanin in each method.

Keywords: Enzymatic technique, Lysozyme enzyme, Phycocyanin extraction, Spirulina microalgae, Ultrasound method



نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران

https://ifstrj.um.ac.ir



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲ ص. ۶۶۱-۶۴۹

کشت سلولی میکروجلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) و مقایسه راندمان روش‌های آنزیمی، اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی و حلال معدنی در استخراج رنگدانه فیکوسیانین

رضا صفری[1]*- سهیل ریحانی پول[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳

چکیده

جهت استخراج رنگدانه‌ها از جلبک‌های دریایی از تکنیک‌های مختلفی استفاده می‌شود که هر تکنیک علاوه بر داشتن معایب و مزایایی، راندمان متفاوتی دارد. یکی از این رنگدانه‌ها، فیکوسیانین است که از روش‌های مختلفی جهت استخراج آن استفاده می‌گردد. هدف پژوهش حاضر کشت میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و استخراج فیکوسیانین از آن با استفاده از چهار روش اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی، آنزیمی و حلال معدنی بود. در مراحل بعد، میزان راندمان هر روش از طریق اندازه‌گیری غلظت و خلوص فیکوسیانین ارزیابی شد. ضمن اینکه اثر اعمال فرایند خالص‌سازی با سولفات آمونیوم نیز بر غلظت و خلوص رنگدانه مستخرج مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد رشد میکروجلبک از زمان صفر تا ۱۴ روز، دارای روند صعودی و تغییرات حاصله نیز در تمامی زمان‌ها، بجز روزهای ۱۴ و ۱۶، معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵). همچنین جلبک بعد از سپری‌کردن فاز سکون کوتاه (۲ روز)، وارد مرحله رشد لگاریتمی شد و تا روز ۱۴ به رشد خود ادامه داد اما بین روزهای ۱۴ و ۱۶، رشد تقریبا روند ثابتی بخود گرفت. در ادامه مشخص شد که میزان توده تولیدشده پس از ۱۶ روز، ۱۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. غلظت فیکوسیانین استخراج‌شده در روش‌های آنزیمی و اولتراسوند (به ترتیب ۱/۸۱۵ و ۱/۷۸۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) فاقد اختلاف معنی‌دار (p>۰/۰۵) و در سطح بالاتری از دو روش دیگر قرار داشت (p<۰/۰۵)؛ ضمن اینکه غلظت رنگدانه در تکنیک انجماد-انجمادزدایی (۱/۵۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بیشتر از روش حلال معدنی (۱/۱۲۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود (p<۰/۰۵). پس از خالص‌سازی رنگدانه با استفاده از سولفات آمونیوم، غلظت و خلوص رنگدانه به صورت معنی‌داری در هر روش افزایش یافت (p<۰/۰۵). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با انتخاب روش بهینه و همچنین اعمال فرایند خالص‌سازی با سولفات آمونیوم، می‌توان راندمان استخراج فیکوسیانین از میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: میکروجلبک اسپیرولینا، استخراج فیکوسیانین، روش اولتراسوند، تکنیک آنزیمی، آنزیم لیزوزیم

مقدمه

طی دهه اخیر، میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*[3] به دلیل دارا بودن ترکیبات منحصر به‌فرد و فوق‌العاده مغذی (Zanganeh *et al.*, 2020) بسیار مورد توجه متخصصین حوزه‌های مختلف به‌خصوص علوم و صنایع غذایی قرار داشته و تحقیقات متعددی نیز پیرامون این میکروجلبک و استفاده از آن در فرمولاسیون مواد غذایی صورت گرفته است (Salehifar *et al.*, 2013; Zanganeh *et al.*, 2020; Barzegar *et al*, 2021; Safari *et al.*, 2022). یکی از ترکیبات مفید و ارزشمندی که از میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* استخراج شده است، رنگدانه فیکوسیانین می‌باشد (Safari *et al.*, 2022). این رنگدانه آبی دارای کاربردهای بسیار گسترده‌ای در صنایع غذایی، پزشکی و داروسازی می‌باشد که همواره انجام تحقیقات پیشرفته و

۱- استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

(*- نویسنده مسئول: Email: Safari1351@gmail.com)

۲- دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78800.1204

3- *Spirulina platensis*

تکمیلی در این زمینه در جریان است. فیکوسیانین دارای خواص درمانی (اثرات مثبت بر تقویت سیستم ایمنی و خواص ضد التهابی)، آنتی اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی نیز می‌باشد و به نوعی می‌توان مواد غذایی مختلف را با این رنگدانه غنی و یا به‌منظور افزایش زمان ماندگاری از آن در فرمولاسیون استفاده کرد (Safari *et al*., 2022).

فیکوسیانین به شکل تجاری توسط میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*، در قالب کشت‌های فتواتوتروف و در محیطهای باز در حوضچه‌های بزرگ و یا استخرهای نقاط گرمسیری و یا نیمه‌گرمسیر در حواشی اقیانوس‌ها تولید می‌شود. کارایی تولید توده زیستی با تامین نور تعیین می‌شود. *اسپیرولینا پلاتنسیس* در چنین کشت‌های میکسوتروف نیز توانایی رشد دارد. نرخ رشد ویژه کشت‌های میکسوتروف با جمع کشت های اتوتروف و هتروتروف برابری می کند. *اسپیرولینا پلاتنسیس* قادر به رشد در شرایط هتروتروف نیز می‌باشد اما از آن جا که نرخ رشد ویژه و محتوای فیکوسیانین در چنین کشت‌هایی پایین است، تولید آن با استفاده از چنین روشی امکان‌پذیر نمی‌باشد. در حال حاضر تولید فیکوسیانین به صورت هتروتروف با استفاده از گونه *گالدیریا سولفورایا*[1] انجام می‌گیرد. این میکروارگانیسم، تک سلولی و گزینه مناسبی جهت تولید فیکوسیانین به صورت هتروتروف می‌باشد. زیستگاه طبیعی آن آب‌های گرم و اسیدی و دمای رشد بهینه این میکروارگانیسم بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد است (Graverholt and Erikse, 2007). اگر چه محتوای فیکوسیانین سلولی این میکروارگانیسم به مراتب کمتر از *اسپیرولینا پلاتنسیس* است اما با تولید توده زیستی ۵۰ گرم در لیتر در روز، باعث تولید فیکوسیانین تقریبا ۱۰ برابر بیشتر از *اسپیرولینا پلاتنسیس* می‌گردد. اخیرا نیز تولید فیکوسیانین نوترکیب بعنوان گزینه ایی مناسب جهت تولید هتروتروف فیکوسیانین مورد توجه قرار گرفته است (Pulz and Gross, 2004; Graverholt and Erikse, 2007).

جهت استخراج ترکیبات موثره (ترکیبات پروتئینی و پلی‌ساکاریدی) از منابع گیاهی از روش‌های مختلف استفاده می‌شود. یکی از روش‌های استخراج پروتئین از ماکرو و میکروجلبک‌ها، روش آنزیمی می‌باشد. در دیواره این موجودات، انواع ترکیبات پلی‌ساکاریدی مثل سلولز، آلژینات، کاراگینان، آگار، نشاسته، گلوکان و ... وجود دارد. آنزیم‌های دارای ماهیت پلی‌ساکاریدازی مثل لیزوزیم، سلولاز، گلوکاناز، آگاراز، گالاکتاز، گزیلاناز باعث هیدرولیز و یا تجزیه ترکیبات پلی‌ساکاریدی و در نتیجه تخریب دیواره سلولی و یا غشای سیتوپلاسمی می‌شوند. در نتیجه ترکیبات درون سلولی از جمله پروتئین‌ها آزاد می‌گردند. علاوه بر این، با فعالیت این آنزیم‌ها، پلی‌ساکاریدهای متصل به پروتئین، تحت تأثیر هیدرولیز آنزیمی قرار گرفته و در نتیجه راندمان استخراج پروتئین افزایش می‌یابد (Joubert and Fleurence, 2008; Harnedy and Fitzgerald, 2013; Bleakley and Hayes; 2017). اولتراسوند یا فراصوت یکی دیگر از روش‌های نوین جهت استخراج مواد موثره و پروتئین‌ها و دارای کاربردهای گسترده‌ای در زمینه استخراج، تجزیه، ریزپوشانی و ... است. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون[2] مربوط می‌شود. برخلاف شیوه‌های مرسوم، امواج صوتی باعث تخریب دیواره سلولی در یک مدت زمان کوتاه می‌شوند و عصاره گیاهی در طول دیواره سلولی انتشار می‌یابد. مشخصات گیاهی مثل میزان رطوبت، اندازه ذرات و نوع حلال مورد استفاده به‌منظور استخراج کارآمد و موثر، مهم هستند. به علاوه فاکتورهای زیادی شامل فرکانس، فشار، دما و زمان، کارکرد امواج صوتی را تحت تأثیر قرار می دهند (Shotipruk and Kaufman, 2001). در تحقیقات مختلف روش فراصوت به همراه سایر روش‌ها نظیر غرقابی، مایکروویو و هموژنیزاسیون جهت استخراج رنگدانه‌ها و مواد موثره گیاهی بصورت منفرد و ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاکی از راندمان بالاتر روش فراصوت در ترکیب با حلال نسبت به سایر روش‌ها بوده است (Ying *et al*., 2011). از مزایای استخراج به کمک امواج فراصوت، افزایش قطبیت سیستم (شامل استخراج کننده، آنالیت‌ها و ماتریس) و افزایش بازدهی استخراج با حفره‌زایی است که می‌تواند مشابه یا بزرگ-تر نسبت به استخراج سوکسله باشد. با توجه به حساسیت رنگدانه‌ها به دماهای بالا، روش فراصوت، استخراج در دماهای پائین را امکان‌پذیر می‌سازد. استخراج با کمک امواج فراصوت امکان افزودن یک استخراج-کننده کمکی را فراهم می‌کند و موجب افزایش قطبیت فاز مایع می‌شود. فراصوت می‌تواند دمای عملیاتی را کاهش دهد و امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم کند. همچنین زمان استخراج نسبت به استخراج سوکسله نیز کوتاه‌تر است. از مزایای استخراج با کمک امواج فراصوت نسبت به استخراج با کمک امواج مایکروویو می توان به سریع‌تر و ساده‌تربودن این روش اشاره‌کرد. در جذب اسید، روش فراصوت نسبت به مایکروویو ایمن‌تر است، به‌طوری‌که به دماها و فشارهای بالا نیاز ندارد. استخراج به کمک امواج فراصوت نسبت به استخراج سیال فوق بحرانی تجهیزات بسیار ساده‌تری نیاز دارد. بنابراین هزینه کل فرایند استخراج بسیار پایین‌تر است. استخراج با کمک فراصوت می‌تواند با هر حلالی برای استخراج دامنه وسیعی از ترکیبات طبیعی استفاده شود. از طرف دیگر، استخراج با سیال فوق بحرانی به طور انحصاری از دی‌اکسیدکربن برای استخراج استفاده می‌کند. بنابراین دامنه آن به آنالیت‌های غیر قطبی محدود است (Vinatoru, 2001). از مهم‌ترین روش‌های فیزیکی جهت استخراج مواد پروتئینی از ماکرو و میکروجلبک‌ها می‌توان به هموژنیزاسیون، استرس و شوک اسمزی اشاره نمود. مطالعات نشان داد که استفاده از روش‌های مذکور

1- *Galdieria Sulphuraria*

2- Cavitation

باعث افزایش استخراج و بازیافت پروتئین از جلبک‌هایی نظیر *اولاوا فاسیاتا*[1]، *سارگاسوم ولگاره*[2] و *پورفیرا آکانتوفورا*[3] می‌شود و نتایج حاکی از کارآیی بالاتر شوک اسمزی نسبت به اولتراهموژنیزاسیون می‌باشد (Barbarino and Lourenço, 2005; Harnedy and Fitzgerald, 2013). یکی دیگر از روش‌های استخراج مواد پروتئینی از جلبک‌ها، میدان پالس الکتریکی می‌باشد. در این روش، جریان الکتریکی باعث افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی می‌شود و الکتروپورشن[4] قابل و یا غیر قابل برگشت رخ می‌دهد. این روش جهت استخراج اجزای درون سلولی مثل پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها و کلروفیل از جلبک‌هایی نظیر اسپیرولینا، *کلرلا ولگاریس*[5]، *نانوکلروپسیس سالینا*[6] مورد استفاده قرار گرفته است (Goettel *et al*., 2013; Coustets *et al*., 2013; Parniakov *et al*., 2015).

به‌منظور استخراج فیکوسیانین از روش‌های مختلفی نظیر انجماد–انجمادزدایی، آنزیمی، اولتراسوند، فشار هیدرواستاتیک بالا، اولتراسانتریفوژ، اولتراهموژنیزاسیون، استخراج با آب و حلال‌های مختلف استفاده شده است که هر یک از روش‌های مذکور دارای مزایا و معایبی هستند (Prabakaran and Ravindran, 2013; Sivasankari *et al*., 2014). هدف تحقیق حاضر در مرحله اول کشت میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* طی ۱۶ روز و ارزیابی روند رشد و تکثیر آن است. در مرحله بعد با استفاده از چهار روش اولتراسوند، انجماد–انجمادزدایی، آنزیمی و حلال معدنی اقدام به استخراج رنگدانه فیکوسیانین و ارزیابی بازده (غلظت و خلوص) هر یک از روش‌های مذکور خواهد شد. ضمن اینکه پس از عمل خالص‌سازی رنگدانه با استفاده از سولفات آمونیوم، مجددا غلظت و خلوص فیکوسیانین اندازه گیری می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت میکروجلبک اسپیرولینا و ارزیابی روند رشد

نمونه خالص جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* از آزمایشگاه جلبک شناسی بخش بیولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. جهت کشت اسپیرولینا از محیط کشت زاروک[7] با ترکیبات متفاوت استفاده و پس از کشت در مقیاس‌های کوچک‌تر (۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتر)، کشت نهایی در حجم‌های ۵ و ۵۰ لیتر انجام گردید (شکل ۱). ترکیبات محیط کشت جلبک مورد مطالعه (pH=۸/۵) در جدول ۱ ارائه شده است. پس از کشت جلبک و قرار دادن در برابر نور فلورسنت با شدت لوکس نوری مناسب (۳۵۰۰ تا ۸۰۰۰) و دوره زمانی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، نمونه‌ها در دمای ۲۹ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۶ روز قرار داده شدند. نمونه‌ها روزانه برای ۳ بار تکان داده شدند تا رشد جلبک به درستی انجام گیرد. به منظور ارزیابی روند رشد توده جلبکی، جذب محلول حاوی سلول‌های جلبک در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. پس از مشاهده شکوفایی جلبکی، نسبت به جمع‌آوری توده سلولی اقدام شد. این فرآیند با استفاده از صافی‌های ۱۰۰ و ۲۰ میکرونی انجام گردید که به‌ترتیب برای جداسازی ذرات بزرگ‌تر و توده جلبک مورد استفاده قرار گرفتند. توده جمع‌آوری شده ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد (این عمل برای کاهش اثرات محیط‌کشت انجام شد). برای خشک کردن جلبک، نمونه‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد آون (بهداد، ایران) برای مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند (Kamble *et al*., 2013; Prabakaran and Ravindran, 2013).



شکل ۱- کشت سلولی میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*

Fig. 1- *Spirulina platensis* microalgae cell culture

جدول ۱- محتویات محیط کشت میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*

Table 1- Contents of *Spirulina platensis* microalgae culture medium

Composition of the culture medium ترکیب محیط‌کشت	Amount (g) میزان
$NaHCO_3$	8
K_2HPO_4	0.5
$NaNO_3$	2.5
K_2SO_4	0.5
NaCl	2
$MgSO_4$	0.2
$FeSO_4$	0.05
Urea	0.2

1- *Ulava fasciata*
2- *Sargassum vulgare*
3- *Porphyra acanthophora*
4- Electroporation
5- *Chlorella vulgaris*
6- *Nannochloropsis salina*
7- Zarrouk medium

استخراج رنگدانه فیکوسیانین از میکروجلبک اسپیرولینا

به‌منظور استخراج رنگدانه فیکوسیانین از میکروجلبک اسپیرولینا، از ۴ روش اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی، آنزیمی و حلال معدنی استفاده شد (شکل ۲). بدین ترتیب که ابتدا ۲ گرم از توده خشک اسپیرولینا به ۴۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار اضافه شد و با قراردادن بر روی هیتر مگنت (به مدت ۳۰ دقیقه)، سوسپانسیون هموژنی از آن تهیه و جهت انجام فرآیند استخراج آماده گردید. در روش اولتراسوند، سوسپانسیون حاوی جلبک به مدت ۱۰ دقیقه و با فرکانس ۲۰ کیلو هرتز سونیکه شد (Prabakaran and Ravindran, 2013). در روش انجماد-انجمادزدایی، سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و پس از آن در دمای ۴ درجه سانتی گراد، انجمادزدایی شد. این فرآیند دو بار تکرار شد (Prabakaran and Ravindran, 2013; Kamble *et al*., 2013). در روش آنزیمی، از آنزیم لیزوزیم جهت هضم و هیدرولیز آنزیمی جلبک استفاده شد که مقدار آن نیز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن خشک جلبک بود (در مطالعه حاضر میزان اسپیرولینای مورد استفاده ۲ گرم بوده است). جهت آغاز هیدرولیز آنزیمی، از لیزوزیم (سیگما، آلدریچ) به همراه EDTA و سدیم‌آزید (مرک، آلمان) به مقدار ۱۰۰ میلی‌مولار (بعنوان عوامل ضدمیکروبی) استفاده شد و نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در حمام آب ۴۴ درجه سانتی‌گراد شیک (اختریان، ایران) شدند. در روش تیمار اسیدی از اسیدکلریدریک (مرک، آلمان) ۱۰ نرمال استفاده و سوسپانسیون حاوی اسید در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد (Prabakaran and Ravindran, 2013). برای روش‌های اولتراسوند و انجماد، پس از انجام فرآیند، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳ ساعت شیک شدند. اما در روش‌های آنزیمی و حلال معدنی، از شیک اضافه استفاده نشد. پس از انجام مراحل فوق، نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Hettick، آلمان) و مایعات رویی (رنگ آبی تیره) برای اندازه‌گیری پیگمان جمع آوری شدند (Prabakaran and Ravindran, 2013; Kamble *et al*., 2013; Jerley and Prabu, 2015).

خالص‌سازی نسبی فیکوسیانین

به منظور خالص‌سازی نسبی رنگدانه فیکوسیانین، از سولفات آمونیوم (مرک، آلمان) با درجه اشباعیت ۴۰ درصد استفاده شد. این ماده به آرامی به محلول حاوی فیکوسیانین اضافه و به مدت یک ساعت هم زده شد. پس از قراردادن نمونه حاوی مخلوط فوق در مکان تاریک و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، فرآیند سانتریفوژ (Kokosan، ژاپن) در دور ۱۵۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید. مایع بی‌رنگ رویی حاصل از سانتریفوژ، دور ریخته شد. سپس به رسوب آبی رنگ، مقداری محلول بافر فسفات (pH=۷) اضافه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Patil *et al*., 2006; Mary Leema *et al*., 2010).



شکل ۲- استخراج نمونه‌های فیکوسیانین از میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*

Fig. 2- Extraction of phycocyanin samples from *Spirulina platensis* microalgae

محاسبه غلظت و خلوص فیکوسیانین در روش‌های مختلف استخراج

برای محاسبه غلظت فیکوسیانین، جذب نوری (اسپکتروفوتومتر، Hitachi، ژاپن) محلول در طول موج‌های ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر قرائت و غلظت فیکوسیانین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طبق فرمول ذیل محاسبه گردید (Kumar *et al*., 2013; Kumar *et al*., 2014). در این رابطه C-PC، غلظت فیکوسیانین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، A_{620}، جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر و A_{652}، جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر است.

$$C\text{-}PC= [(A_{620}-0.474) \times A_{652}]/5.34$$

جهت تعیین مقدار فیکوسیانین بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک جلبک از معادله زیر استفاده گردید (Silveira *et al*, 2007). در این رابطه، V، حجم حلال مورد استفاده و DB، وزن خشک جلبک بر حسب گرم است.

$$B= (C.PC - V)/DB$$

خلوص فیکوسیانین (P) نیز از رابطه زیر محاسبه شد (Muthulakshmi *et al*., 2012).

$$P = OD_{620}/OD_{280}$$

تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا و به منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها بوسیله آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شد.

نتایج و بحث

ارزیابی رشد میکروجلبک

تغییرات رشد و تولید توده سلولی جلبک مورد مطالعه (*اسپیرولینا پلاتنسیس*) در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که رشد از زمان صفر تا ۱۴ روز، دارای روند صعودی و تغییرات حاصله نیز در تمامی زمان‌ها، بجز روزهای ۱۴ و ۱۶، معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵). ارزیابی تغییرات رشد نشان داد که جلبک بعد از سپری‌کردن فاز سکون کوتاه (۲ روز)، وارد مرحله رشد لگاریتمی شد و تا روز ۱۴ به رشد خود ادامه داده است. در ادامه، بین روزهای ۱۴ و ۱۶، رشد تقریبا روند ثابتی بخود گرفته و اصطلاحا جلبک وارد فاز رشد ثابت شد. مطابق جدول ۲، جذب نوری جلبک در طول موج ۵۴۰ نانومتر، از ۰/۰۹ در روز صفر به ۲/۳۲۵ در روز ۱۴ افزایش یافت. بطوری‌که رنگ محیط کشت از سبز روشن به سبز تیره تغییر کرد که این مورد نشان‌دهنده رشد فزاینده جلبک می‌باشد (در مشاهده میکروسکوپی، انبوهی از رشته‌های مارپیچی منظم جلبک در حال حرکت دیده شد). میزان توده خشک جلبک پس از پایان دوره کشت (۱۶ روز)، انجام فرآیند لخته‌سازی، شستشو و خشک‌کردن، ۱۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بود.

جدول ۲- تغییرات جذب نوری میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در زمان‌های مختلف

Table 2- Changes in light absorption of *Spirulina platensis* microalgae at different times

Time (day) زمان	Light absorption of microalgae at 540 nm wavelength جذب نوری میکروجلبک در طول موج ٥٤٠ نانومتر
0	0.09 ± 0.002^{h}
2	0.21 ± 0.014^{g}
4	0.44 ± 0.01^{f}
6	0.83 ± 0.02^{e}
8	1.215 ± 0.02^{d}
10	1.71 ± 0.05^{c}
12	2.165 ± 0.09^{b}
14	2.325 ± 0.077^{a}
16	2.35 ± 0.044^{a}

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵).

Different letters indicate significant differences between the data (p<0.05).

در تحقیقات مختلف جهت کشت اسپیرولینا از روش‌های کشت متفاوت نظیر سیستم‌های بسته یا بچ‌کالچر[1]، فدبچ‌کالچر[2] و یا مداوم[3] و همچنین محیط‌های کشت مختلف بر پایه املاح معدنی نظیر زاروک، جرج، جردن، اف ۲، شولر استفاده شده است که دارای منابع کربنی مانند بی‌کربنات سدیم و کربنات سدیم، منبع نیتروژنی مثل املاح آمونیوم، نیتریت و نیترات و منبع فسفات می‌باشند (Sharma *et al.*, 2014; Ismaiel *et al.*, 2016). نتیجه پژوهش‌های محققین مختلف موید آن است که با تغییر املاح معدنی مورد استفاده، می‌توان شرایط رشد اسپیرولینا را بهینه کرد و به توده بیشتری از جلبک دست یافت (Sharma *et al.*, 2014). جرلی و پروبو (Jerley and Prabu, 2015) از محیط تغییریافته زاروک جهت کشت اسپیرولینا استفاده کردند. میزان توده در طول ۹ روز کشت در pH=۹، ۲۸۰ میلی‌گرم در لیتر بود که در مقایسه با تحقیق حاضر بسیار کمتر می‌باشد (هر چند که زمان کشت اسپیرولینا ۹ روز بوده است). یکی از پارامترهای اصلی در اختلاف رشد و تولید توده جلبکی، نوع و غلظت مورد استفاده املاح معدنی می‌باشد. شیخی نژاد و همکاران (Sheykhinejad *et al.*, 2015) از دو سیستم هوادهی (همزدن با هوا و همزدن با چرخش ظرف کشت) جهت کشت و تولید توده اسپیرولینا در محیط‌های کشت زاروک، اف–۲، شولر و نمک دریا در یک دوره ۱۴ روزه استفاده کردند. نتایج نشان داد که در روش همزدن با هوا، بیشترین و کمترین توده به ترتیب مربوط به محیط‌های کشت زاروک (۴ گرم در لیتر) و نمک دریا (۲/۴۹ گرم در لیتر) است. همچنین در روش همزدن با چرخش ظرف کشت، بیشترین و کمترین توده به‌ترتیب در نمک دریا (۳/۶۹ گرم در لیتر) و محیط اف–۲ (۲/۴۹ گرم در لیتر) ثبت شد. در تحقیق حاضر از روش همزدن با هوادهی ملایم و محیط کشت زاروک استفاده گردید و میزان تولید توده اسپیرولینا کمتر از پژوهش شیخی نژاد و همکاران (Sheykhinejad

1- Batch culture

2- Fed Bacth Culture

3- Photobioreactor

et al., 2015) بود. علت این مورد، عدم کنترل مناسب هوای تزریق‌شده به محیط کشت می‌باشد. اما در تحقیق مذکور (Sheykhinejad *et al.*, 2015) میزان هوای ورودی به صورت کنترل‌شده و با فلوی vvm ۰/۲ و در روش هم‌زدن بصورت چرخشی، میزان دور همزن نیز ۱۵۰ دور در دقیقه بوده است. و همکاران (Ismaiel *et al.*, 2016) گزارش کردند که بیشترین توده اسپیرولینا در دوره کشت ۱۴روزه و pH=۹، معادل ۶۶ میلی‌گرم وزن توده در ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت است که مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. علاوه بر املاح معدنی، پارامترهای دیگر نظیر نور و طول دوره روشنایی و تاریکی، دما، زمان و تغییرات pH از فاکتورهای اصلی جهت بهینه‌سازی شرایط رشد و تکثیر اسپیرولینا می‌باشند. دما و pH مناسب جهت رشد اسپیرولینا به‌ترتیب ۳۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰-۹ هستند که در اکثر تحقیقات از شرایط مذکور استفاده می‌شود (Kuddus *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014). با تغییر در پارامترهای کلیدی و ایجاد استرس، می‌توان میزان تولید برخی از متابولیت‌ها از جمله رنگدانه‌ها را افزایش داد. به‌عنوان مثال در تحقیقات مختلف گزارش شد که با افزایش درصد نمک سدیم در محیط کشت، اضافه‌نمودن اوره به‌عنوان منبع ازت و کاهش نسبی pH به ۸/۵-۸، می‌توان میزان تولید رنگدانه فیکوسیانین را افزایش داد (Kuddus *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013). نتایج تحقیق فرجی و همکاران (Faraji *et al.*, 2012) نشان داد که افزایش نور، روش فدبچ کالچر و سوبسترای گلوکز دارای تاثیرات مثبت بر تولید رنگدانه هستند اما با این وجود، افزایش دما میزان تولید فیکوسیانین را کاهش می‌دهد. در پژوهش حاضر شرایط متفاوت بود؛ بطوری‌که دوره نوری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و روش کشت نیز به صورت بسته یا بچ‌کالچر تعریف شد. در روش فدبچ‌کالچر به دلیل تزریق مواد مغذی با روند افزایشی در بازه‌های زمانی مختلف، رشد و تکثیر جلبک مطلوب‌تر صورت می‌گیرد و در نتیجه میزان توده بیشتری تولید می‌شود. دمای مورد استفاده در پژوهش فرجی و همکاران (Faraji *et al.*, 2012) جهت کشت، ۲۹ تا ۳۱ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه رشد اسپیرولینا) بود اما با افزایش دما، روند رشد کاهش یافت که دلیل آن نیز اختلال در متابولیسم سلولی است. در پژوهش جوشی و همکاران (Joshi *et al.*, 2014)، کشت آزمایشگاهی اسپیرولینا در حضور سوبستراهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط‌های کشت تهیه‌شده در قالب تیمارهای مختلف حاوی آب پنیر، ادرار گاو، آب باران و آب‌شهری تعریف شدند و میزان کلروفیل و پروتئین در توده تولیدشده محاسبه گردید. نتایج نشان داد که با طولانی‌شدن زمان پرورش جلبک (۱۵ روز)، فاکتورهای فوق روند صعودی دارند. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که به دنبال استفاده از منابع ارزان در فرمولاسیون محیط پایه زاروک، جهت تامین ازت و سایر پارامترها، می‌توان به توده بیشتری از جلبک دست یافت. با تغییر در فرمولاسیون محیط کشت می‌توان زمان شکوفایی جلبک را کاهش داد و در زمان کوتاه‌تر به توده بیشتر رسید. در پژوهش حاضر، اسپیرولینا در طول ۱۶ روز به بالاترین میزان رشد رسید که مشابه نتایج جوشی و همکاران (Joshi *et al.*, 2014) می باشد. به هنگام کشت اسپیرولینا در محیطهای کشت معمولی و زاروک بدون تغییر، زمان رسیدن جلبک به بالاترین میزان رشد، معمولا ۲۵ روز طول می‌کشد. در برخی از محیط کشت‌ها مثل کانوی مدیوم، این زمان به ۳۰ روز هم می‌رسد (Qaeni *et al.*, 2012). سرویا و مهتا (Sarvaiya and Mehta, 2016) در تحقیق خود به ارزیابی رشد اسپیرولینا در محیطهای کشت مختلف نظیر زاروک، CFTRI، OFERR، زاروک+PGR و VITAL BIOTECHپرداختند و تاثیر دما، pH، نور و همزدن در طول دوره ۲۰ روزه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که دامنه توده تولیدشده بین ۱/۲۵-۰/۴۰ گرم وزن خشک در لیتر متغیر است. نتایج توده تولیدشده مشابه پژوهش حاضر می‌باشد؛ با این تفاوت که دوره کشت جلبک در تحقیق پیش رو ۱۶ روز بود. در مقایسه محیطهای کشت مورد استفاده، محیط VITAL BIOTECH مطلوب‌تر از بقیه نتیجه داد. نتایج تحقیق سرویا و مهتا (Sarvaiya and Mehta, 2016) نشان داد؛ هر چند که فاکتورهای مورد بررسی بر روند رشد اسپیرولینا تاثیرگذار هستند اما دو پارامتر هم زدن و نور از فاکتورهای کلیدی جهت دستیابی به بالاترین توده و بیوسنتز پروتئین می‌باشند.

مقایسه غلظت و خلوص فیکوسیانین در روش‌های مختلف استخراج

نتایج غلظت و خلوص فیکوسیانین استخراج‌شده با روش‌های اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی، آنزیمی و حلال معدنی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که استخراج آنزیمی و اولتراسوند بیشترین راندمان را جهت استخراج فیکوسیانین دارند ($p>0.05$). ضمن اینکه روش‌های انجماد-انجمادزدایی و حلال معدنی (اسیدکلریدریک) به‌ترتیب در مراتب بعدی قرار گرفتند ($p<0.05$). مطابق جدول ۳، خلوص اولیه فیکوسیانین (قبل از تیمار با سولفات آمونیوم) در روش‌های مورد استفاده، فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p>0.05$).

جدول ۳- مقایسه غلظت و خلوص فیکوسیانین در روش‌های مختلف استخراج

Table 3- Comparison of phycocyanin concentration and purity in different extraction methods

Extraction methods روش‌های استخراج	Phycocyanin concentration (mg/ml) غلظت فیکوسیانین	Purity (A_{620}/A_{280}) خلوص
Enzymatic (lysozyme) آنزیمی (لیزوزیم)	1.815±0.06[a]	0.825±0.04[a]
Ultrasound اولتراسوند	1.786±0.02[a]	0.821±0.01[a]
Freeze-defrosting انجماد-انجمادزدایی	1.535±0.03[b]	0.823±0.02[a]
Hydrochloric acid هیدروکلریک‌اسید	1.121±0.05[c]	0.820±0.02[a]

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵)؛ برای هر تیمار، ۵ تکرار انجام شد.

Different letters in each column indicate significant differences between the data ($p<0.05$); for each treatment, 5 replications were done.

یافته‌های این بخش حاکی از کارآیی بالاتر روش‌های آنزیمی و اولتراسوند نسبت به دو روش دیگر در استخراج فیکوسیانین از میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* می‌باشد. به نظر می‌رسد که استفاده از حلال معدنی، ساختار مولکولی پروتئین فیکوسیانین را تحت تاثیر قرار می‌دهد و روش مناسبی برای استخراج این پروتئین نیست. این روش بیشتر برای استخراج ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدها از گیاهان و میکروجلبک‌ها کاربرد دارد (Kumar *et al*., 2013; Kuddus *et al*., 2013). در روش‌های آنزیمی، انجماد-انجمادزدایی و اولتراسوند در حقیقت از تیمارهای بیوشیمیایی و فیزیکی جهت تخریب دیواره سلولی اسپیرولینا استفاده می‌شود. در نتیجه انتظار بر این است که راندمان فیکوسیانین استخراج‌شده نیز نسبتا بیشتر باشد. بنابراین کارایی استخراج، خلوص و غلظت فیکوسیانین به روند تخریب پوشش سلولی بستگی دارد. در این تحقیق از آنزیم لیزوزیم استفاده شد و از آنجا که این آنزیم دارای فعالیت گلیکوزیدازی است، پیوند گلیکوزیدی ۱-۴ بین ان‌استیل‌مورامیک‌اسید[1] و ان‌استیل‌گلوکزآمین[2] پپتیدوگلیکان دیواره سلولی جلبک را تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به آزادسازی متابولیت های مختلف از جمله فیکوسیانین می‌گردد. شایان ذکر است که جلبک-های سبز-آبی یا سیانوفیت‌ها به دلیل وجود پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی، به باکتری‌ها شباهت دارند. علاوه بر این، در روش آنزیمی، EDTA و بافر فسفات با کلاته‌کردن یون منیزیم و تخریب غشای سیتوپلاسمی، باعث آزادشدن فیکوسیانین می‌گردند. در روش اولتراسوند، بدنبال استفاده از امواج اولتراسونیک، سلول‌های جلبک متلاشی و متابولیت‌های مختلف آزاد می‌شوند. هر دو روش آنزیمی و اولتراسوند مشابه روش‌های انجماد و حلال معدنی، بطور غیرانتخابی عمل می‌کنند و در نتیجه در عصاره بدست‌آمده علاوه بر فیکوسیانین، رنگدانه‌های دیگر مثل آلوفیکوسیانین، فیکواریترین[3]، زاگزانتین، آستاگزانتین، لوتئین و کلروفیل نیز وجود دارند (Moraes *et al*., 2011; Wu *et al*., 2016). مطالعات مختلفی در خصوص استخراج رنگدانه‌های جلبکی خصوصا فیکوسیانین و بهره‌گیری از روش‌های مختلف اولتراسوند، ترکیبی از اولتراسوند و غوطه‌وری در حلال آلی، اولتراهموژنیزاسیون، انجماد-انجمادزدایی، سیال فوق بحرانی، مایکروویو، حلال‌های آلی و معدنی انجام شده است (Kuddus *et al*., 2013; Sivasankari *et al*., 2014; Wu *et al*., 2016). در پژوهش مورائس و همکاران (Moraes *et al*., 2011)، از شش روش استخراج شامل روش‌های شیمیایی (اسیدهای آلی و معدنی)، فیزیکی (انجماد-انجمادزدایی، فراصوت و هموژنیزاسیون) و آنزیمی (لیزوزیم) جهت استخراج فیکوسیانین استفاده شد. نتایج نشان داد که روش اولتراسوند دارای کارآیی بالاتری نسبت به سایر تکنیک‌ها است و بعد از آن به ترتیب روش انجماد-انجمادزدایی قرار دارد. این یافته مطابق با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. احتمالا میکروجلبک اسپیرولینا تحت تاثیر امواج اولترسوند قرار گرفته و با بهینه‌سازی پارامترهای استخراج نظیر فرکانس، آمپلی‌تود، زمان و تعداد سیکل، می‌توان به بالاترین راندمان استخراج دست یافت. دی جسوس و همکاران (De Jesus *et al*., 2016) در مطالعه مروری خود به روش‌های استخراج فیکوسیانین از میکروجلبک‌های مختلف اشاره و گزارش کردند که روش‌هایی نظیر تیمار حرارتی، هموژنیزاسیون، انجماد-انجمادزدایی، نیتروژن مایع و شوک اسمزی از طریق تخریب سلولی میکروجلبک، منجر به رهاسازی متابولیت‌های مختلف از جمله فیکوسیانین می‌شوند. مطالعه مروری

1- N-Acetylmuramic acid

2- N-Acetylglucosamine

3- Phycoerythrin

مذکور نشان داد که روش‌های مورد استفاده ممکن است بصورت منفرد و یا ترکیبی و همراه با روش‌هایی نظیر آنزیمی مورد استفاده قرار گرفته که در برخی از موارد، استفاده از روش‌های ترکیبی اثر افزایشی و یا سینرژیستی بر هم دارند و راندمان استخراج فیکوسیانین را افزایش می دهند. در پژوهش حاضر، استخراج فیکوسیانین بدون بهره‌گیری از تیمار اولیه صورت گرفت و از روش‌های ترکیبی استفاده نگردید. نتیجه‌گیری که دی جسوس و همکاران (De Jesus *et al*., 2016) از مطالعه خود بیان داشتند آن بود که هر چند اتخاذ روش‌های مناسب استخراج، بر راندمان فیکوسیانین تاثیرگذار می‌باشد، اما تازگی توده و گونه مورد نظر از فاکتورهای اصلی هستند که غلظت نهایی فیکوسیانین را تعیین می-کنند. وو و همکاران (Wu *et al*., 2016) در تحقیق خود از روش تلفیقی انجماد-انجمادزدایی بمدت ۱ ساعت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد و متعاقب آن اولتراسوند در ۶ میکرون آمپلی‌تود به مدت ۳ دقیقه استفاده کردند. در پژوهش مذکور، نمونه‌ها پس از سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰۰g بمدت ۳۰ دقیقه و جداسازی مایع رویی، از نظر غلظت فیکوسیانین مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که غلظت فیکوسیانین در دو آزمایش مجزا و منبع نور متفاوت سفید و قرمز به‌ترتیب ۰/۷۲۸ و ۳/۲۷۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر که از منبع نور سفید نیز استفاده شد، کمتر می‌باشد (۱/۸۱۵-۱/۱۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). علت اختلاف غلظت فیکوسیانین احتمالا بدلیل فرمولاسیون متفاوت محیط‌های کشت است که در پژوهش حاضر از زاروک تغییریافته و در مطالعه وو و همکاران (Wu *et al*., 2016) از محیط کشت F/2 مدیوم (یا محیط تغییریافته گیلارد) استفاده گردید. سیواسنکاری و همکاران (Sivasankari *et al*., 2014) از روش‌های مختلف انجماد-انجمادزدایی، حلال آلی و معدنی، اولتراسوند، هموژنیزاسیون و بافر فسفات سدیم جهت استخراج فیکوسیانین استفاده کردند. نتایج حاکی از کارایی بالای تکنیک انجماد-انجمادزدایی در جداسازی فیکوسیانین بود. همچنین کمترین غلظت فیکوسیانین در دو روش حلال معدنی و اولتراسوند ثبت شد. در پژوهش مذکور، تأثیر زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روند استخراج فیکوسیانین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت رنگدانه در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت دارای اختلاف معنی‌دار است اما این روند در ۷۲ ساعت فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشد. نتایج غلظت فیکوسیانین در روش‌های مورد استفاده توسط سیواسنکاری و همکاران (Sivasankari *et al*., 2014) بجز روش اولتراسوند، مشابه روش‌های انتخاب‌شده در تحقیق حاضر است و اختلاف در غلظت فیکوسیانین در روش اولتراسوند احتمالا بدلیل نوع فرکانس انتخاب‌شده، زمان مورد نظر و تعداد سیکل در دوره زمانی مشخص می‌باشد. در پژوهش هدیانتو و سوتریس نورهادی (Hadiyanto and Suttrisnorhadi, 2016) از روش تلفیقی حلال و اولتراسوند جهت استخراج فیکوسیانین از اسپیرولینا استفاده شد و نتایج نشان داد که بیشترین راندمان استخراج رنگدانه مربوط به دمای ۵۲/۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۴۲ دقیقه و فرکانس ۴۲ کیلو هرتز است (۱۵/۷درصد). در حالی‌که در تیمار حاوی حلال اتانول بصورت منفرد، راندمان استخراج ۱۱/۱۳ درصد ثبت شد. در تحقیق حاضر اولتراسوند بصورت منفرد مورد استفاده قرار گرفت و فرکانس و زمان مورد استفاده به‌ترتیب ۲۰ کیلو هرتز و ۱۰ دقیقه و غلظت فیکوسیانین نیز ۱/۷۸۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش گردید.

خالص‌سازی فیکوسیانین استخراج‌شده با استفاده از سولفات آمونیوم

جدول ۴، نتایج خلوص و غلظت فیکوسیانین را پس انجام فرایند خالص‌سازی با استفاده از سولفات آمونیوم ۴۰ درصد نشان می‌دهد. از مقایسه جدول ۳ و ۴ مشخص می‌شود که پس از انجام فرایند تخلیص فیکوسیانین با ماده مذکور، خلوص و غلظت فیکوسیانین استخراج‌شده با هر روش نیز افزایش یافته است. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، اگرچه که پس از انجام فرایند تخلیص، خلوص رنگدانه در روش‌های مختلف استخراج فاقد اختلاف معنی‌دار (با وجود ارتقا نسبت به قبل از فرایند تخلیص) است ($p>0/05$) اما بین غلظت فیکوسیانین در برخی از تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p<0/05$). به این صورت که حداکثر غلظت مربوط به فیکوسیانین مستخرج با روش‌های آنزیمی (لیزوزیم) و اولتراسوند ($p>0/05$) است. ضمن اینکه این غلظت در روش انجماد-انجمادزدایی به صورت معنی‌داری بیشتر از روش حلال معدنی (اسید کلریدریک) می‌باشد ($p<0/05$).

نتایج این بخش نشان داد که با اعمال تیمارهای مختلف می‌توان درصد خلوص فیکوسیانین را افزایش داد که این موضوع به کاربرد فیکوسیانین در صنایع مختلف (آرایشی، بهداشتی، غذایی، دارویی و آزمایشگاهی) بستگی دارد. تحقیقات مختلف نشان داد که استفاده از روش‌های ترکیبی نظیر سولفات آمونیوم، دیالیز و کروماتوگرافی تعویض یونی می‌تواند درصد خلوص فیکوسیانین را بطور معنی‌داری افزایش دهد (Moraes *et al*., 2011; Jerley and Prabu, 2015; Wu *et al*., 2016). نتایج پژوهش موتولاکشمی و همکاران (Muthulakshmi *et al*., 2012) نشان داد که به هنگامی‌که نسبت A_{620}/A_{280} از ۴ بیشتر باشد، فیکوسیانین استخراج‌شده دارای درجه آزمایشگاهی و دارویی است و زمانی‌که این مقدار بین ۰/۷ تا ۳/۹ باشد جهت مصارف غذایی و آرایشی قابل استفاده می‌باشد. با توجه به این مطلب، خلوص فیکوسیانین استخراج‌شده در تحقیق حاضر قابلیت استفاده در مواد غذایی و آرایشی را دارا می‌باشد (۱/۱۳۵، روش آنزیمی).

جدول ٤- غلظت و میزان خلوص فیکوسیانین در تیمارهای خالص‌سازی‌شده با سولفات آمونیوم

Table 4- Concentration and degree of purity of phycocyanin in purified treatments using ammonium sulfate

Extraction methods روش‌های استخراج	Purity (A_{620}/A_{280}) خلوص	Phycocyanin concentration (mg/ml) غلظت فیکوسیانین
Enzymatic (lysozyme) آنزیمی (لیزوزیم)	1.135±0.08[a]	3.751±0.05[a]
Ultrasound اولتراسوند	1.131±0.05[a]	3.748±0.07[a]
Freeze-defrosting انجماد-انجمادزدایی	1.132±0.03[a]	3.705±0.02[b]
Hydrochloric acid هیدروکلریک‌اسید	1.128±0.04[a]	3.523±0.08[c]

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵)؛ برای هر تیمار، ۵ تکرار انجام شد.

Different letters in each column indicate significant differences between the data ($p<0.05$); for each treatment, 5 replications were done.

دی جسوس و همکاران (De Jesus *et al.*, 2016) در پژوهش خود به روش‌های مختلف خالص‌سازی فیکوسیانین از جمله کروماتوگرافی تعویض‌یونی، اولتراسانتریفوژ، الکتروفورز، ژل فیلتراسیون کروماتوگرافی، اولترافیلتراسیون، کیتوزان، زغال فعال، سولفات آمونیوم، یونیزاسیون شعله‌ای و تلفیقی از روش‌های مذکور از میکروجلبک‌هایی نظیر اسپیرولینا، آنابنا[1]، پورفیرا[2]، آفانوکاپسا[3] پرداختند و مزایا و معایب روش‌ها را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که استفاده از سولفات آمونیوم در مرحله اول و متعاقب آن اولترافیلتراسیون، درصد خلوص فیکوسیانین را بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد. همچنین استفاده از سولفات آمونیوم به تنهایی قادر به افزایش خلوص فیکوسیانین نیست و در حقیقت، خالص‌سازی بطور نسبی انجام می گیرد. وو و همکاران (Yu *et al.*, 2017) در تحقیق خود از سولفات آمونیوم ۳۰٪ جهت خالص‌سازی اولیه فیکوسیانین و سپس از اشکال مختلف کروماتوگرافی مثل کروماتوگرافی تعویض‌یونی، کروماتوگرافی ستونی هیدروکسی‌آپاتیت و کروماتوگرافی هیدروفوبیک به‌منظور خلوص بالاتر رنگدانه استفاده کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که بدنبال استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، غلظت و درصد خلوص فیکوسیانین افزایش معنی‌دار پیدا می‌کند. بنابر یافته‌های تحقیقات مذکور، با اتخاذ روش‌های مناسب جهت خالص‌سازی فیکوسیانین، می توان به خلوص بالاتری از آن جهت استفاده در علوم پزشکی نظیر نشان‌دار کردن آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی (بعنوان ماده فلورسنت) دست یافت.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج تحقیق حاضر، تکنیک اولتراسوند و روش آنزیمی (لیزوزیم) به منظور استخراج رنگدانه فیکوسیانین از میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* کارائی مطلوب‌تری نسبت به روش‌های انجماد-انجمادزدایی و حلال معدنی (اسیدکلریدریک) دارند. همچنین تکنیک انجماد-انجمادزدایی در این زمینه کاراتر از روش حلال معدنی است. مطابق یافته‌ها، خالص‌سازی رنگدانه مستخرج با استفاده از سولفات آمونیوم ۴۰ درصد، موجب افزایش غلظت و خلوص فیکوسیانین در هر روش می‌گردد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با انتخاب روش بهینه و همچنین اعمال فرایند خالص‌سازی با استفاده از سولفات آمونیوم، می‌توان راندمان استخراج فیکوسیانین از میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* را افزایش داد.

سپاسگزاری

محققین تحقیق حاضر بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و همچنین پژوهشکده اکولوژی دریای خزر جهت حمایت مالی و در اختیار نهادن تجهیزات تخصصی تقدیر و تشکر به عمل آورند.

1- Anabaena
2- Phorphyra
3- Aphanocapsa

منابع

1. Barbarino, E., & Lourenço, S.O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *17*(5), 447-460. https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4
2. Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, *6*(5), 33. https://doi.org/10.3390%2Ffoods6050033
3. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., Zanganeh, N., & Abdolnabipoor, E. (2021). Effect of *Spirulina platensis* microalgae powder as an egg white substitute on the sponge cake properties. *Journal of Food Science and Technology*, *108*(17), 31-44. https://dx.doi.org/10.52547/fsct.17.108.31
4. Coustets, M., Al-Karablieh, N., Thomsen, C., & Teissié, J. (2013). Flow process for electroextraction of total proteins from microalgae. *The Journal of Membrane Biology*, *246*(10), 751-760. https://doi.org/10.1007/s00232-013-9542-y
5. De Jesús, V.C., Gutiérrez-Rebolledo, G.A., & Hernández-Ortega, M. (2016). Methods for extraction, isolation and purification of C-phycocyanin: 50 years of research in review. *International Journal of Food and Nutritional Science*, *3*(3), 2-10. https://doi.org/10.15436/2377-0619.16.946
6. Faraji, D., Rezaei, K., & Golmaei, M. (2012). *Optimization of phycocyanin production from spirulina algae under culture conditions*. Master's thesis in the field of food industry. Islamic Azad University, Varamin branch.
7. Graverholt, O.S., & Eriksen, N.T. (2007). Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(1), 69-75. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1150-2
8. Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, *2*(4), 401-408. https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.07.004
9. Harnedy, P.A., & FitzGerald, R.J. (2013). Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. *LWT-Food Science and Technology*, *51*(1), 375-382. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.023
10. Hadiyanto, H., & Suttrisnorhadi, S. (2016). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae *Spirulina platensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 227-234. https://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2015-05-193
11. Ismaiel, M., El-Ayouty, Y.M., & Piercey-Normore, M.D. (2014). Antioxidants characterization in selected cyanobacteria. *Annals of Microbiology*, *64*(3), 1223-1230. https://doi.org/10.1007/s13213-013-0763-1
12. Joubert, Y., & Fleurence, J. (2008). Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, *20*(1), 55-61. https://doi.org/10.1007/s10811-007-9180-9
13. Joshi, S.M., Bera, M.B., & Panesar, P.S. (2014). Extrusion cooking of maize/spirulina mixture: factors affecting expanded product characteristics and sensory quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(2), 655-664. https://doi.org/10.1111/jfpp.12015
14. Jerley, A.A., & Prabu, D.M. (2015). Purification, characterization and antioxidant properties of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Scrutiny International Research Journal of Agriculture, Plant Biotechnology and Bio Products*, *2*(1), 7-15.
15. Kamble, S.P., Gaikar, R.B., Padalia, R.B., & Shinde, K.D. (2013). Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *3*(8), 149-153. https://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2013.3826
16. Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. *BioMed Research International*, 1-9. https://doi.org/10.1155/2013/742859
17. Kumar, D., Kumar, N., Pabbi, S., Walia, S., & Dhar, D.W. (2013). Protocol optimization for enhanced production of pigments in Spirulina. *Indian Journal of Plant Physiology*, *18*(3), 308-312. https://doi.org/10.1007/s40502-013-0045-8
18. Kumar, D., Dhar, D.W., Pabbi, S., Kumar, N., & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*, *19*(2), 184-188. https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7
19. Leema, J.M., Kirubagaran, R., Vinithkumar, N.V., Dheenan, P.S., & Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from Arthrospira (*Spirulina*) platensis cultured in seawater. *Bioresource Technology*, *101*(23), 9221-9227. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.120

20. Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P., & Kalil, S.J. (2011). C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *28*, 45-49. https://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322011000100006
21. Muthulakshmi, M., Saranya, A., Sudha, M., & Selvakumar, G. (2012). Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from Spirulina isolated from fresh water body against various human pathogens. *Journal of Algal Biomass Utilization*, *3*(3), 7-11.
22. Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(6), 635-648. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x
23. Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S., & Raghavarao, K.S.M.S. (2006). Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, *1127*(1-2), 76-81. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.073
24. Prabakaran, P., & Ravindran, A.D. (2013). Efficacy of different extraction methods of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *International Journal of Research in Pharmacy and Life Sciences*, *1*(1), 15-20.
25. Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015). Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *27*, 79-85. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.11.002
26. Qaeni, M., Hashtroudi, M., & Qaderi, F. (2012). Investigation of chlorophyll a and carotenoids in spirulina microalgae. *Journal of Marine Biology*, *3*(14), 1-7.
27. Shotipruk, A., Kaufman, P.B., & Wang, H.Y. (2001). Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable menthaxpiperata using ultrasonic extraction. *Biotechnology Progress*, *17*(5), 924-928.
28. Silveira, S.T., Burkert, J.D.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., & Kalil, S.J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, *98*(8), 1629-1634. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050
29. Salehifar, M., Shahbazizadeh, S., Khosravi, K., Bahmadi, H., & Ferdowsi, R. (2013). Possibility of using microalgae *Spirulina platensis* powder in industrial production of Iranian traditional cookies. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, *7*(4), 63-72.
30. Sharma, G., Kumar, M., Ali, M.I., & Jasuja, N.D. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *Microbial and Biochemical Technology*, *6*(4), 202-206. https://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000144
31. Sivasankari, S., & Ravindran, D. (2014). Comparison of different extraction methods for phycocyanin extraction and yield from *Spirulina platensis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *3*(8), 904-909.
32. Sheykhinejad, A., Lababpour, A., & Moazami. (2015). Increasing cyanobacteria *Spirulina* production with mixing and cyanobacteria spirulina production with mixing and chemical composition of culture medium. *Plant Research Journal*, *28*(2), 353-344.
33. Sarvaiya, A., & Mehta, J. (2016). Biomass estimation of *Spirulina platensis* under different physical and chemical environment. *International Journal of Recent Biotechnology*, *4*(2), 14-24.
34. Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., & Ghaffari, H. (2022). Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga Spirulina (*Spirulina platensis*) and use of resulting nanoparticles in ice cream formulation. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, *123*(19), 145-159. https://dx.doi.org/10.52547/fsct.19.123.145
35. Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, *8*(3), 303-313. https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2
36. Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of Toxicology*, *90*(8), 1817-1840. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5
37. Ying, Z., Han, X., & Li, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, *127*(3), 1273-1279. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.083
38. Yu, P., Wu, Y., Wang, G., Jia, T., & Zhang, Y. (2017). Purification and bioactivities of phycocyanin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(18), 3840-3849. https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668
39. Zanganeh, N., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. (2020). Investigation of the effect of different *Spirulina platensis* levels on nutritional, physicochemical and sensory properties of sponge cake. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *16*(2), 207-220. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v16i2.81859